Dr. R. MARCHESINI

INDIRIZZO

alla

NICA MICROSCOPICA

ROMA

cietà Editrice Dante Alighieri

INDIRIZZO

ALLA

TECNICA MICROSCOPICA

DEL

Dr. RINALDO MARCHESINI

DOTTORE IN MEDICINA ED IN SCIENZE NATURALI

ROMA

Società Editrice Dante Alighieri

1894.

INTRODUZIONE

Questo modesto libro è scritto per voi o giovani che incominciate lo studio della tecnica microscopica. Esso vi deve porre al caso di poter subito lavorare con pochi mezzi, ed avendo ancora limitate cognizioni d'istologia.

Ho evitato più che potevo le descrizioni anticipate perchè non pratiche, ed ho cercato così condurvi gradatamente all' acquisto di tante cognizioni nuove, indicandovi man mano il modo come acquistarle senza fatica.

Degli strumenti e dei reagenti voi troverete notati solo quelli che vi saranno indispensabili; e di tutti, ogni volta che l'occasione si è presentata, ne ho descritta l'utilità ed il valore.

Voi avrete così riunite tutte quelle nozioni puramente necessarie per fare preparati isto-

logici di tutti gli organi, esposte con un metodo essenzialmente pratico.

Volendovi poi perfezionare nello studio dell'istologia e della tecnica microscopica non vi mancheranno trattati da consultare; ed io mi auguro che questo mio libretto vi possa servire di guida nell' arduo cammino degli studi superiori.

Dott. Rinaldo Marchesini.

PARTE PRIMA

§. I.
Microscopio e modo d' usarlo.

Il microscopio è l' istrumento di cui noi ci serviamo per le nostre osservazioni.

Per ora a noi interessa sapere, che il microscopio risulta composto di due parti essenziali: di una parte ottica e di una parte meccanica.

La parte ottica non è che un tubo composto ad uso canocchiale, che si può più o meno allungare, ed ai cui due estremi sono posti due sistemi di lenti, dei quali, quel sistema che guarda l'oggetto, che si deve osservare, è detto *obiettivo*, e quello che guarda il nostro occhio è detto *oculare*.

Guardando un oggetto, acconciamente preparato su vetrini, attraverso di questi due sistemi di lenti,

esso viene più o meno ingrandito, a seconda le lenti e la lunghezza del tubo ; e perciò questo pezzo è il vero microscopio, il resto non sono che congegni per rendere più comoda e più perfetta la visione.

La parte meccanica invece risulta di un piede metallico, per lo più a ferro di cavallo, sul quale è inserito il tubo del microscopio, mediante viti speciali. Questo piede porta inoltre inserito, a due terzi circa d'altezza, una piastra di metallo, forata nel mezzo, e che è detta *tavolo del microscopio* ; sul quale tavolo poniamo l'oggetto da osservare. Al disotto del tavolo ed innestato ad esso c' è un disco metallico girante, pur esso con fori, ma di diverso diametro, il quale è detto *diaframma* ; e serve a dar passaggio ad un fascio di raggi luminosi, più o meno grande, a seconda l'occorrenza.

Questi raggi luminosi vi sono proiettati da uno *specchio* sottostante, innestato pure esso al fusto del microscopio, e che per movimento di viti speciali può adattarsi in modo da dirigere il fascio di raggi luminosi, attraverso al foro del tavolo, nell'oggetto da osservare. Questo deve esser posto sopra vetri speciali, che diconsi *portaoggetti*, e che sono vetri di forma rettangolare e per lo più misurano 28×70^{mm}. E i vetri poi coi quali si copre l'oggetto da osservare son detti *coprioggetti* e son vetrini piccoli, di forma per lo più quadrata, e che misurano in generale

20 × 20^{mm}, di spessore minimo, ed anzi tanto migliori quanto più fini di spessore.

Disposto così il preparato sul piatto del microscopio, bisogna orientare lo specchio in maniera, che i raggi da esso rifratti vadano a passare per il foro mediano del tavolo del microscopio, e così ad illuminare il preparato che vi si è posto sopra.

Una delle difficoltà grandi che incontrerà sempre il principiante è la *messa* in *fuoco*, ossia la maniera di trovare subito a che distanza focale debba stare la lente obiettiva dall'oggetto, perchè quest'oggetto ingrandito possa vedersi chiaramente dall'occhio di chi osserva. — Non vi sono leggi precise a questo riguardo ; ma volendo guardare un oggetto, e metterlo perciò al fuoco del microscopio, dopo che l'oggetto si è illuminato bene mediante lo specchio, si deve con l' indice ed il pollice della mano sinistra tenere il vetro porta oggetti, posato sul tavolo del microscopio, e muoverlo leggermente sul tavolo : con la destra si deve frattanto far girare il tubo del microscopio nel suo sostegno, e nello stesso tempo spingerlo dolcemente in giù verso l'oggetto ; fino a che non si osserva, attraverso il microscopio dall' occhio che guarda, una penombra, la quale, poichè con la mano sinistra si è detto, che contemporaneamente si debba muovere il preparato, si deve veder muovere. A questo punto si tralasci di spingere il tubo del micro-

scopio, e si ricorra invece alla *vite micrometrica*, che trovasi inserita al di dietro del tubo del microscopio. Mediante questa vite, girando verso destra o verso sinistra, si possono imprimere al tubo del microscopio dei movimenti minimi e mettere così alla giusta visione l'oggetto da osservare.

Il passo di questa *vite micrometrica* è sempre in tutti i microscopi fatto in modo che girando da destra a sinistra il tubo del microscopio si abbassa, mentre girando verso destra il tubo del microscopio si alza.

La *vite micrometrica* si deve adoperare solo quando si è vicinissimi al fuoco, e servirsene solo per porre al fuoco esatto l'oggetto.

Un buon aiuto per trovare il fuoco possono essere pure le bolle d'aria, che per caso si trovino nel preparato. Scorgendo una bolla d'aria è segno che siamo presso al fuoco, ed allora non resta che come abbiamo detto, girare convenientemente la vite micrometrica.

Una cosa che non è mai di troppo il raccomandarla è, che tutti gli oggetti, lenti e vetri siano bene detersi, e s'adoperi sempre la massima pulizia.

Eccovi cosi esposte le primissime cognizioni, che a mio credere, possono mettervi allo caso d' adoperare un microscopio per i preparati più comuni.

§ II.

Strumenti e reagenti.

Gli strumenti e reagenti necessari al vostro lavoro per ora non sono che pochissimi, cioè dovete avere fra gli strumenti: *un paio di forbici*, *un bisturi*, *due aghi*, e come vedete è ben poca cosa e neanco dispendiosa.

Gli *aghi* saranno necessari a voi per dilacerare in minime parti il pezzo di tessuto che vorrete esaminare, onde disporlo adattamente all'osservazione: essi sono perciò assolutamente indispensabili.

Sulla struttura di questi aghi nulla v' è da dire, perchè li potrete costruire anche da voi stessi, infiggendo in un manichino di legno un comune e grosso ago inglese.

Il *bisturi* lo sceglierete piccolo, leggermente panciuto e desso per ora non deve servirvi che per tagliare e togliere quel di più inutile dopo lo sfibramento, senza alterare e smuovere la preparazione; adoperandolo come una finissima sega.

In quanto alle *forbici* è preferibile che sieno lunghe, fine e necessariamente molto taglienti.

I *reagenti* che voi ora adopererete per la preparazione a fresco, si riducono anche essi a poca cosa.

Sono indispensabili:

Una soluzione di cloruro di sodio a 0,75 %,
» » di acido acetico all' 1 %,
» » di glicerina diluita con metà di acqua,
» » di acido nitrico al 20 %,
» » di potassa al 35 %,
» » di alcool ad $^1/_3$ (due di acqua, uno di alcool),
» » dell'alcool ordinario.

Il *cloruro di sodio* a 0,75 % è detta una soluzione fisiologica o liquido indifferente, perchè è stato provato con relative esperienze, che in essa soluzione i tessuti organici non sopportano alcuna alterazione, e vi si trovano come nel siero sanguigno: in una parola è un siero che noi ci fabbrichiamo artificialmente.

L'adoprerete perciò quando avrete bisogno di un liquido indifferente che, senza produrre alcuna reazione chimica speciale, serva semplicemente a rendere trasparente il preparato, che non sarebbe altrimenti visibile all'asciutto.

L'*acido acetico* all' 1 % ha una parte importante come mezzo rischiaratore, giacchè mette bene in evidenza il nucleo delle cellule e rende più diafano il protoplasma. L'adoprerete quindi ogni qualvolta siavi necessario di mettere in evidenza i nuclei cellulari,

ed inoltre come si è detto per rendere più chiaro e trasparente il protoplasma.

La glicerina vi servirà pure specialmente come mezzo chiarificante e come liquido conservatore dei tessuti, per la sua proprietà d' assorbire l'acqua, e per la sua evaporazione quasi insensibile.

La potassa al 35 %₀ vi riuscirà utile per l'esame dei peli, delle squame epidermiche e per tutte le sostanze in cui v' è cheratina: essa ha proprietà dissolventi e rammollienti; poichè scioglie parecchie granulazioni del protoplasma, forma saponi solubili colle sostanze grasse. Per queste sue proprietà voi l'adoprerete anche per lo studio del tessuto elastico, il quale viene così rammollito e dissociato nei suoi elementi fibrosi.

L'acido nitrico al 20 %, serve in microscopia come maceratore e dissociante. Con questa soluzione il Kölliker potè dimostrare che i nastrini muscolari dei muscoli lisci sono costituiti da tante fibre muscolari, unite tra loro da cemento scarsissimo, solubile in questo reattivo, il quale fa inoltre spiccare nettamente i nuclei cellulari e in specie quelli delle emazie nucleate.

L'alcool ad un terzo (Ranvier), formato da una parte di alcool assoluto e due di acqua distillita, ha proprietà eminentemente dissocianti, perchè scioglie il cemento che unisce le cellule fra loro; e perciò l'adoprerete per osservare le cellule epiteliali isolate.

L' alcool ordinario, oltre ad essere un liquido conservatore serve anche bene a mettere in evidenza la striatura longitudinale delle fibre muscolari striate.

Conosciute così queste nozioni fondamentali della tecnica microscopica, passiamo ad esaminare le più opportune norme in dettaglio per lo allestimento dei preparati a fresco.

§. III.
Preparati a fresco.

Noi intendiamo per preparati a fresco quelli che non hanno subìto un previo trattamento con alcool o con altro liquido induratore, e che si fanno prendendo un pezzetto di un organo fresco, e dilaceratolo cogli aghi, s'osserva subito in una goccia di liquido opportuno, a seconda della qualità del tessuto da esaminare.

Questi preparati possono essere transitorî o permanenti. Affinchè siano permanenti è necessario di chiuderli con un mastice appropriato. Di questo mastice di chiusura ne parleremo più avanti.

1. — Cellule epiteliali pavimentose isolate.

Per vederle ben isolate e non alterate affatto nella loro struttura, si abrada leggermente col dorso del

bisturi la propria lingua, ed il pochissimo materiale così raccolto si stemperi in una goccia di cloruro di sodio a 0,75 %, previamente posto sul portaoggetti: si copra col coprioggetti e s'osservi al microscopio. Voi vedrete allora alcune cellule isolate del tessuto epiteliale pavimentoso, e ne vedrete altre ancora tra loro unite. Queste cellule che originariamente erano rotonde, per compressione reciproca, in seguito ad accrescimento, hanno preso una forma poligonale ed appiattita, donde il nome di pavimentoso al tessuto che compongono; fatto cioè a guisa di tante mattonelle. Oltre queste cellule che costituiscono l'epitelio pavimentoso della lingua, potete osservare altri elementi cellulari rotondi, incolori, granulosi, che si trovano costantemente e si dicono *corpuscoli salivari*. Sono essi muniti di nucleo, ed in fondo non sono che leucociti, che si originano dagli organi linfoidi della bocca e specialmente delle tonsille.

Un'altra cosa da osservare, e che sempre capita in simili preparati, sono le *bolle d'aria*, di varia dimensione e di varia forma, ma per lo più rotondeggianti; che distinguerete perchè hanno contorno oscuro, grossolano. Queste bolle d'aria si trovano sempre miste alla saliva, e vi saranno utili a mettere facilmente a foco il preparato, come già è stato detto. Oltre questi elementi nella saliva si trovano anche bacilli di diversa specie, non che filamenti più o meno

lunghi con spore, (leptotrix buccalis), più copiosi nei fumatori, ed in quelli che tengono poco pulita la propria bocca. Questi parassiti vegetano rigogliosamente nella nostra bocca, formandovi buona parte del tartaro dei denti.

2. — Cellule epiteliali cilindriche e ciliate, isolate.

Per osservare l'epitelio cilindrico vi servirete della mucosa dello stomaco o dell' intestino di rana; per l'epitelio ciliato della mucosa dell' esofago, non che di quella palatina, tolti dalla rana vivisezionata.

Tagliate in piccoli pezzi questi organi e lavateli bene con acqua. Dopo lavati li terrete per un quarto d'ora circa nell'alcool ad 1[3; e da qui presone uno dei pezzetti con la pinza, lo sbatterete sopra il portaoggetti, finchè si stacchino dei brandelli d'epitelio. Dall'intestino e dallo stomaco avrete cellule epiteliali cilindriche isolate, mentre dall'esofago e dalla membrana palatina otterrete ben isolate le cellule epiteliali ciliate. Frammezzo a queste cellule troverete anche delle cellule caliciformi mucipare, che talora si presentano come un piccolo fiasco, o una piccola bottiglia; tutte modificazioni di forma, dovute alla compressione laterale, fatta loro dalle cellule cilindriche circostanti. Volendo però fare una buona preparazione di cellule ciliate isolate, è necessario immergere il pezzo anatomico, dopo lavato, in una soluzione di

acido osmico all'1 %, per 5' e quindi passarlo nell'alcool ad 1|3 secondo il solito.

3. — Epitelio cilindrico ciliato vivente.

Per fare questa preparazione tagliate la testa ad una rana vivente, togliete dalla testa la mascella inferiore e con una forbice pulita e tagliente, portate via un piccolo brandello della mucosa palatina. Distendete questo brandello sopra il portaoggetti, badando che non sia ripiegato, aggiungete una goccia d'acqua coprite e guardate col microscopio. Alla periferia del brandello, dove è più trasparente il preparato vedrete un' ondulazione prodotta da tutte ciglia vibratili, a guisa di un campo di biada mossa dal vento. Se i movimenti delle ciglia si arrestano, potrete ravvivare il movimento aggiungendo una goccia di cloruro di sodio a 0,75 %, che porrete ad un lato del coprioggetti, e che succhierete dall'altro lato con un pezzettino di carta bibula ; e ciò perchè il movimento delle ciglia vibratili si ravviva in un ambiente leggermente alcalino.

3. — Tessuti connettivi.

a) Connettivo propriamente detto.

Prendete un brandello del mesenterio di gatto, distendetelo bene sul portaoggetti, ed aggiungendovi una goccia di cloruro di sodio a 0.75 %, copritelo

ed osservatelo al microscopio. Il mesenterio è anche buonissimo per lo studio del tessuto adiposo. Esaminerete qui i fasci di connettivo, il loro modo di disporsi, il loro andamento ondulato, le areole che formano; così le cellule fisse situate sopra i fasci ed aderenti ad essi. Delle cellule migranti, se qualcuna vi capita di vederne dentro gli spazi lacunari, sapete che non sono altro che le cellule bianche del sangue: riguardandosi le lacune connettivali, come lacune linfatiche.

Volendo fare una preparazione di *fibrille isolate*, dissocierete con gli aghi un pezzetto di mesenterio di rana, oppure di gatto, ed aggiungendovi una goccia di cloruro di sodio, l'osserverete al microscopio.

b) Tessuto connettivo reticolato.

Prendete delle ghiandole mesenteriche dei gatti od anche un pezzo di milza, fatene con rasoio affilato dei tagli il più possibilmente sottili; ponete questi tagli in un tubo da saggio, riempito per metà d'acqua distillata e sbattetelo per circa 5 minuti primi. Ovvero deponete questi tagli sul vetro portaoggetti e tenuti fissi con una mano armata di un ago, con l'altra mediante un pennello intriso di continuo nell'acqua, spennellate questi tagli nel miglior modo possibile; allo scopo di spazzar via tutti i leucociti innicchiati nelle maglie strette del connettivo. Se dopo questo

lavoro esaminate questi tagli in una goccia di cloruro di sodio, vi riuscirà facile vedere distinto il reticolo a strette maglie, che forma lo stroma di tutte le glandole linfatiche e che costituisce la specie del così detto tessuto reticolato.

c) Tessuto adiposo.

Come avete visto, bellissimo tessuto adiposo, da fare ottimi preparati, si trova prendendo e distendendo in una goccia di cloruro di sodio un brandello di mesenterio di gatto.

d) Tessuto mucoso.

Il tessuto mucoso costituisce il cordone ombelicale ed il corpo vitreo nell'adulto, esso rappresenta del tessuto connettivo embrionale, dove i fasci di tessuto connettivo non sono ancora formati.

Su un gran numero di animali, come le razze, i cefalopedi ad esempio, questo tessuto persiste in tutta la vita. E voi appunto per ottenere delle belle preparazioni farete, in vicinanza delle cortilagini della testa di questi animali, dei sottili tagli e questi osserverete in una goccia di cloruro di sodio, per avere un buon preparato di tessuto mucoso.

e) Tessuto elastico.

Per esaminare le fibre elastiche vi servirete del ligamento della nuca di un bue, che facilmente po-

trete avere. Tagliato questo ligamento in piccoli pezzi, si tenga per 24 ore nella potassa al 35 %. Dopo questo tempo è facile d'isolare e di fare una bella preparazione, dilacerando con gli aghi, di fibre elastiche.

Distinguerete le fibre elastiche per questi caratteri principali: per essere molto resistenti ai reattivi (potassa, acido nitrico ecc.); per avere un indice di rifrazione fortissimo; per presentarsi ramificate, e per la mancanza assoluta di nuclei e di cellule. Questi caratteri sono abbastanza sufficienti per farle distinguere da qualunque altro tessuto fibroso con cui potessero confondersi.

Volendo preparare la *membrana fenestrata*, formata da tessuto elastico, basta asportare dei piccoli brandelli dalla tunica intima delle grosse arterie, ed osservarli in una goccia di potassa al 35 %.

f) Tessuto cartilagineo.

Vivisezionate una rana e messo a nudo lo sterno di essa, vedrete la porzione ensiforme di questo fatta da una lamina sottilissima di cartilagine jalina; la quale tagliata con le forbici, e deposta sul portaoggetti con una aggiunta di una goccia di acido acetico all'1 %, otterrete una bellissima preparazione di cartilagine jalina.

La *cartilagine elastica* e la *connettivale* si rinveranno: la prima nell'orecchio, nella epiglottide e nelle

cartilagini di Wrisberg ; la seconda nei legamenti intervertebrali e nelle cartilagini interarticolari. Ma per preparare queste cartilagini si richiede di farne delle sottilissime sezioni con rasojo, e trattarle poi nel medesimo modo con l'acido acetico. Esse non differiscono del resto dalla cartilagine jalina che per la forma della sostanza intercellulare, che in queste, in luogo di essere omogenea, è formata da fibre elastiche o da fibre connettivali.

È da avvertire che per questi preparati bisogna evitare l'uso a lungo dell'acqua, perchè rigonfia e rende torbida la cartilagine.

Per studiare poi la *trasformazione del tessuto cartilagineo nel tessuto osseo*, vi basterà fare sezioni sottili della epifisi di una cartilagine fetale (agnello, vitello ecc.).

Una *varietà di cartilagine jalina*, in cui le cellule sono ramificate, si trova nel cranio cartilagineo dei *cefalopodi* (calamaj).

g) Tessuto osseo.

Prenderete per questo studio una diafisi di un osso lungo (femore), e ne farete con una piccola sega da orologiajo delle fettoline sottili in senso longitudinale e trasversale. Porrete queste sezioni fra due pezzi di pomice, ben levigati e piani, e stropicciandole così e bagnandole con acqua continuamente, le

ridurrete sottili il più possibile. Poi lavatele bene in acqua ed asciugatele, le osserverete in una goccia di balsamo denso. Così facendo nelle lacune ossee vi rimane l'aria, e non potendovi perciò penetrare il balsamo, queste lacune con le loro finissime ramificazioni (canalicoli ossei) spiccheranno in nero, in mezzo al resto della sostanza ossea, bianca.

Volendo *decalcificare un osso*, per osservare meglio i canali di Havers e le lamelle ossee, e per vedere a colpo d'occhio la struttura di un osso, bisogna ricordarsi di fissarlo prima nel liquido del Müller, (vedi appresso) ed indurirlo poi in alcool, prima di decalcificarlo. La decalcificazione può farsi con acido nitrico, o cloridrico, o picrico, ma voi preferirete l'acido nitrico al 3 %, che ricambierete spesso, fino a che il pezzo sia completamente decalcificato. A questo punto lo laverete bene per più ore con acqua corrente, e poi induritolo con gli alcool graduati, (vedi appresso) ne farete delle sezioni sottili col rasoio.

h) Midolla delle ossa.

Anche questa preparazione potrete fare con molta facilità. Si spacchi un femore di rana, si prenda il *midollo giallo* con la punta del bisturi e si stemperi con una goccia di cloruro sodico a 075 %.

Per preparare il *midollo rosso* serve bene una

costola di mammifero qualunque (cane, gatto agnello) questa si spacca e raschiando con il bisturi la midolla, si depone poi sul porta-oggetti in una goccia di cloruro di sodio a 0,75 %.

i) Tessuto dentario.

Per i denti valgono le stesse regole tecniche ora date pel tessuto osseo, solo è da osservare che, invece di tagliarne delle fettoline e porle fra due pezzi di pomice, bisogna fissarli con cera lacca su un pezzo di sughero, e limarli fino a renderli sottilissimi.

5. — Tessuto muscolare.

Come saprete il tessuto muscolare è di due sorta, liscio e striato.

I muscoli lisci si trovano copiosi negli organi della cosidetta vita vegetativa, e in genere il loro movimento non è dipendente dalla volontà dell'individuo. Voi per prepararli prenderete dei piccoli pezzi d'intestino di rana, o meglio di gatto, e li terrete per 12 ore e più in una soluzione d'acido nitrico al 20 % (Kölliker), e sciacquati bene in acqua distillata li dissociarete accuratamente con gli aghi in una goccia pure di acqua. Otterrete così che l'acido nitrico sciogliendo il cemento, che tiene unite le fibrille tra di loro, ve le farà vedere isolate in modo da potere ap-

prezzarne la forma a fuso sottile, con il loro nucleo centrale caratteristico a bastoncello.

Per osservare poi le *fibre muscolari striate* basta prendere un pezzetto di un muscolo dalla coscia di una rana e dissociarlo con gli aghi.

Come liquido d'aggiunta adoprerete o il cloruro di sodio a 0,75 %, o l'acido acetico all'1 %, ovvero l'alcool ordinario, a seconda l'osservazione che vorrete fare. Col cloruro di sodio avrete una preparazione normale, senza che il liquido abbia alcuna azione microchimica elettiva sopra qualche parte di questo tessuto. Invece con l'acido acetico vedrete messi in evidenza i nuclei del sarcolemma, ed a preferenza la striatura trasversale della fibra. Con l'acool ordinario o con l'alcool ad $^1/_3$ vedrete accentuarsi di più la striatura longitudinale, e la tendenza quindi della fibra a scindersi nelle fibrille primitive. Volendo poi fare dei bellissimi preparati per isolamento di fibrille e di dischi, e dove si possano distinguere bene le strie chiare e le strie scure, come le strie secondarie; è necessario allora ricorrere ai muscoli delle ali e delle zampe di un insetto d'acqua dolce, quale è l'*Hydrophilus piceus*. E come reattivo potrete adoprare l'acido cloridrico all'1 per 500 o l'alcool ad $^1/_3$, e dopo alcune ore vedrete la tendenza delle fibre a scindersi in dischi di Bowmann od in fibrille.

Per avere una preparazione di *fibre muscolari*

ramificate si sceglierà la lingua di una rana. Le fibre del cuore presentano pure una varietà nella forma per i rapporti che esse hanno fra di loro, da formare reti più o meno complesse. Per questa preparazione vi servirete dei medesimi reattivi, già sopra menzionati.

6. — Tessuto nervoso.

Il tessuto nervoso risulta di fibre mieliniche, amieliniche, di cellule e di sostanza intercellulare; ma ora ci occuperemo delle sole fibre nervose. *Le fibre mieliniche* si preparano prendendo il nervo sciatico di una rana. Sfibratene con gli aghi un pezzo in una goccia di cloruro di sodio a 075 %, ed osservatelo al microscopio. Perchè la dissociazione avvenga bene terrete fisso con un ago, disposto orizzontalmente, il nervo, con l'altro ago sfibrarete il nervo a ventaglio.

Tagliate poi, con un bistori panciuto, il nervo nel punto dove lo tenete fisso sul portaoggetti e così avrete senza molta fatica delle fibre mieliniche isolate; dove osservarete la guaina di Schwann, gli strozzamenti di Ranvier e la mielina.

Volendo veder bene anche le incisure di Lantermann, che oggi sappiamo corrispondere ai lati dei cestellini conici di neurocheratina scoperti dal Golgi, è necessario di porre il nervo, appena tolto dall'animale, in una soluzione d'acido osmico all'1 % e far-

velo restare per 5' a 10', finchè diventi nero. Allora, sciacquato bene, si sfibra e si osserva in cloruro di sodio.

Per mettere poi in evidenza il *cilindro dell'asse*, prendete un pezzo di nervo sciatico, sfibratelo a secco sollecitamente e ponetevi sopra una goccia di collodion, che spanderete premendo leggermente il copri-oggetti.

Per preparare le *fibre norvose amieliniche*, o di Remak, o della vita vegetativa, come si vogliono dire, è buono un polmone di rana. Si spacchi questo polmone e si sciacqui bene, per togliere tutto il sangue, e quindi se ne distenda un pezzo sul portaoggetti si asciughi con carta bibula e vi si aggiunga poi (prima di coprirlo) una goccia d' acido acetico all'1 %. Osservando al microscopio, si vedranno decorrere nel mezzo del tessuto polmonale numerosi fasci di fibre di Remak, che si ramificano dicotomicamente ; e questi fasci sono distinguibili per i numerosi nuclei allungati e disposti secondo l'andamento delle fibre.

La preparazione *delle cellule nervose* è facile averla schiacciando un pezzo di cervello di rana o di midollo spinale fra due vetrini, ed aggiungendovi poi una goccia della soluzione di bleu di metilene al 3 %. Si vedranno così le cellule nervose piramidali con i loro prolungamenti.

Si potrá fare anche di queste cellule una preparazione a secco (all'Ehrlich) e conservarla, schiacciando fra due vetrini un poco di polpa di midollo spinale; e stirando poi questi vetrini l'uno sull'altro, d'averne su ciascuno di essi uno strato sottile di polpa nervosa. A questo punto s'essicchi rapidamente alla lampada il preparato, si colori con bleu, si essicchi di nuovo; e posta sul portaoggetti una goccia di balsamo vi si ponga, sopra la preparazione così colorata, il coprioggetti e tutto è pronto per l'osservazione.

7. — Sangue

Per studiare il sangue di un animale non si deve fare altro che metterne una goccia sul porta-oggetti, coprirla ed osservarla al microscopio. Se il sangue è di rana ne vedrete le emazie ovoidali, del diametro di 25 u. circa, nucleate; ed i leucociti globulari, bianchi e molto più piccoli (12 μ circa).

Nel sangue umano, e nel sangue dei mammiferi in genere, le emazie invece sono piccole (da 6 a 7 μ) non hanno nucleo; i leueociti invece sono più grandi (8 a 12 μ). Cosicchè possiamo ritenere, come regola generale, che i leucociti, o cellule bianche del sangue, presentano quasi lo stesso diametro (12 μ) in tutta la scala zoologica, e per conseguenza sono più grandi delle emazie in quegli animali (uomo) che le hanno piccole, e sono più piccole dell'emazie in quegli animali (rana), che hanno emazie grandi.

Volendo vedere le piastrine del Bizzozero è necessario ricorrere ad una preparazione speciale; bisogna deporre cioè sul proprio dito, prima di fare la puntura, una o due gocce di un miscuglio filtrato di una soluzione acquosa di violetto di metile all' 1 %, misto ad una soluzione di cloruro di sodio a 0,35 %. Pungendo il dito, nello spazio occupato da questa goccia, il sangue che ne esce si mescola subito con il violetto di metile, e le piastrine vengono così subito colorate in violetto e fissate ad un tempo. Questa goccia di sangue in tal modo colorata si fa aderire alla superficie di un vetrino coprioggetti; questo si depone sul portaoggetti e s'osserva a forte ingrandimento.

Per avere poi una preparazione di fibrina, basta far coagulare una goccia di sangue, distesa sopra un coprioggetto, e sottoporla poi ad un continuo getto di acqua, finchè si scolori completamente: così l'emazie ed i leucociti sono portati via dalla corrente, l'emoglobina solubilissima nell'acqua sparisce, e rimangono aderenti al vetrino solo dei fili bianchi di fibrina.

Per avere dei cristalli d'emoglobina, i quali però variano di forma a seconda la specie dell' animale, disponete una goccia di sangue, (preferibile di porcellino d' India) sopra un portaoggetti e fatelo essiccare. Appena secco ponete sopra il sangue una goccia d'acqua, copritelo con il coprioggetti e ponetelo ad

essiccare al sole. Come si dissecca il liquido, si formeranno i cristalli d' emoglobina.

Per i cristalli d'ematoidina è necessario di trovare un focolaio emorragico, ovvero un corpo luteo; dove si rinvengono belli e formati.

Tra i cristalli del sangue, quelli, che sono di massimo interesse per la medicina legale, sono i *cristalli d'emina* o del Tecihmann, i quali si ottengono in questo modo: deponete una goccia di sangue, di un animale qualunque, sul portaoggetti e fatelo essiccare. Essiccato si rimescoli con l'aggiunta d'una o due gocce d'acido acetico glaciale, mediante una bacchetta di vetro. Esponetelo poi alla fiamma d' una lampada a spirito, ed appena l' acetico incomincia a bollire la preparazione è fatta. Ciò avviene perchè si sviluppa del cloro libero (dal cloruro di sodio che è nel sangue), che in presenza dell'ematina, in cui si scompone l' emoglobina, e l'acqua, si forma un cloroidrato d'ematina, detto in una sola parola *emina*, che cristallizza in tavole rombiche rossobrune.

Se però il sangue è di vecchia data, allora è necessario d'aggiungervi un piccolissimo cristallino di cloruro di sodio, per avere la reazione. Si capisce bene che il cloro, che deve combinarsi colla ematina viene messo in libertà dall' acido acetico il quale forma col cloruro di sodio un acetato di sodio cristallizzabile.

8. — Vasi sanguigni.

Per fare una preparazione di vasi sanguigni ricorrerete ad un pezzo di polmone o ad un pezzo del mesenterio di rana. Dopo d'averli sciacquati bene, li distenderete sopra un portaoggetti, aggiungendo poi una goccia di acido acetico all'1 $^0/_0$.

Riconoscerete i vasi specialmente per la presenza di numerosi nuclei allungati e posti trasversalmente (e perciò da non confondersi con fasci di fibre di Remak) alla lunghezza del vaso, e che sono i nuclei della tunica media o muscolare. Fatta attenzione a questi, è facile poi distinguere le altre tuniche che compongono il vaso. Dalla presenza di questi nuclei e dal modo di disporsi potrete anche riconoscere se trattasi di piccole arterie o di piccole vene; poichè nelle piccole arterie i nuclei della tunica muscolare sono numerosissimi, essendo molto sviluppata in queste la tunica mediana, e disposti tutti trasversalmente; nelle piccole vene invece, i nuclei della tunica mediana o muscolare sono scarsi e disposti anche irregolarmente, perchè nelle piccole vene è poco sviluppata questa tunica, ed abbonda invece la tunica esterna, avventizia o connettivale.

§. IV.
Micrometria.

Per misurare al microscopio gl'elementi istologici, si servono i micrografi d'un istrumento speciale detto *micrometro oculare*, che imparerete poi ad adoperare. A voi invece basterà per ora di conoscere un termine di confronto per ottenere approssimativamente queste misure. Voi giá sapete che l'emazie umane misurano da 6 a 7 μ (micromillimetri) (1); ora basterà pensare quante emagie occorrono per coprire completamente l'oggetto microscopico, del quale si vogliono misurare le dimensioni, e moltiplicare per il numero di dette emazie, il diametro dell' emazia, preso come unitá di misura, cioè 7^{u}, per ottenere delle misure approssimativamente esatte. (Moriggia).

§. V.
Preparazioni a fresco permanenti.

Voi ora sapete come dovete fare le preparazioni a fresco (vedi sopra), che diremo volanti, per distin-

(1) Si suole in microscopia rappresentare con la lettera greca μ il micromillimetro, che corrisponde alla millesima parte di un millimetro.

guerle dalle permanenti, le quali per essere tali debbono esser chiuse, per toglierle dal contatto dell'aria e conservarle per un tempo più o meno lungo.

Per fare le preparazioni a fresco permanenti bisogna fissare gli elementi, ossia bisogna adoperare dei reattivi chimici, che fissino le cellule nello stato in cui si trovano, allorchè si tolgano dall' animale; e in modo che non si alterino più nella forma. — Questi reattivi sono detti *fissatori* e di essi ne parleremo in avanti. (Vedi pag. 32).

Per lo scopo nostro vi basta ora sapere adoperare la soluzione all' 1 per 100 di sublimato corrosivo a cui siano aggiunti 60 centigrammi di cloruro di sodio.

Metodo. Prendete dei piccoli pezzetti del tessuto che volete preparare ed appena tolti dall'animale, recentemente ucciso, lavateli rapidamente ed immergeteli nella soluzione di sublimato suddetto, per 3 ore e poi lavateli abbondantemente in acqua distillata. Soggiorno per 48 ore in alcool jodato (alcool ordinario con qualche goccia di tintura di jodio) poi passaggio in alcool ordinario. A questo punto, se si tratta di mucose, e si vogliano prepararne le cellule isolate, basta che l'immergiate per un'ora in alcool $^1/_3$, procedendo a seconda abbiamo detto sopra, riguardo alle cellule epiteliali isolate (vedi pag. 10).

Se si tratta di altri pezzi anatomici che non si

debbono dissociare, ma semplicemente sfibrare, allora dopo che li avete fissati col sublimato, lavateli ed adoperate poi quei reattivi che, come abbiamo veduto, si richieggono singolarmente per ognuno di essi: quindi sottoponeteli allo sfibramento con gli aghi; aggiungete una goccia o due di glicerina o di cloruro di sodio 0,75 $^0/_0$ ed apponetevi il coprioggetti.

Un fissatore più sbrigativo è la soluzione d'acido osmico all' 1 per 100, ove basta tenere i pezzi per 5' a 10', sciacquarli e passarli subito negli alcool; ma questo fissatore costa 8 lire il grammo!

Volendo poi ottenere, anche questi preparati, colorati, non si deve fare altro, allorchè sono stati fissati, che porli, dopo sciacquati, in un liquido colorante.

Sul modo poi di comporre i principali liquidi coloranti, sul tempo necessario d'immersione, sulle loro qualità speciali ne parleremo diffusamente più avanti.

Tenuto a colorare il pezzo anatomico per pochi minuti, si lava e poi, o si pone al solito in alcool ad $^1/_3$, se è per avere elementi isolati (mucose); ovvero si sfibra: si aggiunge quindi una goccia di acido acetico 1 $^0/_0$, o di glicerina e si copre.

Sicchè riepilogando avremo per il primo caso:

a) *Lavaggio* del pezzetto anatomico in acqua distillata.

b) *Fissamento* in acido osmico 1 % per 5'010', o sublimato 1 % per 3 ore.

c) *Lavaggio* di nuovo in acqua distillata.

d) *Passaggio* in alcool jodato se la fissazione è stata fatta con il sublimato.

e) *Macerazione* in alcool $^1/_3$ *ovvero sfibramento.*

f) *Chiusura* in glicerina, o in acido acetico 1 %.

E nel 2º caso, volendo gli elementi colorati:

a) *Lavaggio*, come sopra.

b) *Fissamento* id. id.

c) *Lavaggio* id. id.

d) *Colorazione* (emetossilina, carminio, eosina).

e) *Lavaggio*.

f) *Macerazione* o sfibramento.

g) *Chiusura*, come sopra.

Per fare queste preparazioni bisogna essere molto esatti e puliti, altrimenti non si avranno mai buoni resultati. E così pure bisogna assaggiare se la colorazione è arrivata, e tenere i pezzi più tempo a colorare nel caso che gli elementi istologici tardassero ad imbeversi della colorazione, e ciò perchè non sempre è sufficiente il medesimo tempo.

Chiusura umida. Siamo finalmente giunti al punto di poter conservare le nostre preparazioni, e tenerle così pronte per la circostanza che ci servissero di studiarle.

Prima però di parlare della maniera di chiudere

i preparati, è bene di sapere perchè questi preparati devono essere chiusi in liquidi acquosi.

Il liquido che s'aggiunge agli elementi istologici che s'osservano al microscopio; ha più scopi: prima di tutto perchè la luce non passerebbe attraverso elementi che si essiccassero, e sarebbe quindi tolto lo scopo dell'osservazione; poi perchè l'indice di rifrazione si rende omogeneo e gli oggetti vengono così messi in vista; poi ancora perchè alcuni liquidi hanno la proprietà di rendere trasparente l'oggetto che si osserva, sciogliendo alcune sostanze, che altrimenti resterebbero opache.

A questo riguardo se a voi è sufficiente rendere semplicemente umida la preparazione, vi servirete della soluzione di cloruro di sodio 0,75 %, come liquido fisiologico; che se poi volete unire a questa l'azione rischiarante, adoprerete allora la glicerina o l'acido acetico 1 %.

Mastice di chiusura. Perchè i preparati si mantengano nel liquido aggiunto, è necessario che questo liquido non evapori, ed a questo scopo s'appone, allo intorno dei margini del coprioggetti, un mastice che opponendosi che avvenga quest'evaporazione, serve per mantenere così conservati per lungo tempo i preparati.

Per *formare il mastice* voi prenderete della cera vergine e della colofonia, e fonderete queste due so-

stanze in una capsula con la proporzione di metà di cera vergine e metà di colofonia.

Dovendo però fare la chiusura di un preparato bisogna che badiate prima che non vi sia rimasta alcuna bolla d'aria, e che ai margini il coprioggetti sia bene asciutto, asciugandolo se occorre con carta bibula ; altrimenti il mastice non vi aderirebbe.

Allorchè tutto è pronto, fondete il mastice alla lampada da renderlo perfettamente liquido, e con un pennello intriso in detto mastice deponete prima quattro piccole goccie di esso agli angoli del coprioggetti, come quattro punti di presa perchè il vetrino non possa più scorrere, e poi, immerso di nuovo il pennello nel mastice, scorrete leggermente con esso sopra ogni lato del vetrino ; in modo da coprirne una piccola parte per lato : avrete così una chiusura permanente.

Per vedere se per caso qualche lato del vetrino fosse rimasto scoperto, guardate il preparato, ad occhio nudo, per trasparenza, ed aggiungete una piccola goccia di mastice in quel punto dove la chiusura non vi sembrerà perfetta.

PARTE SECONDA

§. I.

Organi.

Per riuscire allo studio esatto dei varii tessuti in un organo nel loro stato normale, e conoscere anche la struttura dell' organo stesso, sono necessarie diverse manipolazioni, che qui secondo l'ordine successivo per lo studio, vi verrò esponendo.

Prima di tutto perchè un tessuto si possa osservare nel suo stato, come si trova nell'organismo, sono indispensabili due cose; 1. cioè che il tessuto od organo venga preso da un animale appena ucciso, e se da cadavere umano, subito dopo le 24 ore dalla morte; 2. che il pezzetto di organo venga immediatamente fissato, ed in seguito sottoposto all'ulteriori manipolazioni.

Liquidi fissatori.

Noi intendiamo colle parole *fissare un organo*, quel trattamento fatto con alcuni reagenti chimici, (che precipitano le sostanze albuminose, e le rendono perciò insolubili ed inalterabili), sopra i tessuti freschi; cosicchè siano mantenuti in quello stato che essi hanno nell' organismo. Poichè, in vista di questi fissatori, non potendo i vari elementi istologici perdere i loro rapporti, nè alterarsi nella loro forma, in seguito a tutte le manipolazioni, che debbono successivamente subire, siamo sicuri di potere osservare il tessuto allo stato normarle, o quasi.

Molti sono i liquidi adoperati come fissatori; ma interessa a voi, almeno per ora, di conoscere la virtù di pochi tra i migliori; sia per brevità di manipolazioni, sia per il poco costo e per la sicura e facile riuscita.

Parleremo perciò solamente dell' *alcool assoluto*, *dell'acido ormico* all'1 %, della *soluzione di sublimato corrosivo*, del *liquido del Müller* e del *liquido Kleinenberg*.

L'alcool assoluto è un buon fissatore ed induritore nello stesso tempo, comodo perchè è alla portata di tutti; esso però raggrinza un poco i pezzi anato-

mici per la rapida disidratazione. È preferibile allorchè si vogliano avere reazioni microchimiche distinte non essendo nè un acido, nè un alcali. I pezzi vi debbono rimanere almeno per 24 ore.

L'acido osmico all'1 % è il più energico fissatore ed il più sicuro; però annerisce le sostanze grasse, attacca facilmente le mucose e perciò bisogna essere assai cauti nello adoprarlo, e di più è molto costoso. I pezzi d'organi vi si tengno immersi per 5' a 10'.

Il bicloruro di mercurio in soluzione all'1 % e coll'aggiunta di 60 centg. % di cloruro sodico è un ottimo fissatore, e non sciupa i pezzi anatomici; però bisogna togliere l' eccesso di sublimato mettendo i pezzi nell' alcool jodato, altrimenti lascia depositare dei cristalli che rovinano la preparazione; l'immersione è di 3 ore.

Il liquido del Müller, che è formato da:

Bicromato di potassa	2
Solfato di soda	1
Acqua	100

è un eccellente fissatore ed induratore nello stesso tempo; costa poco, ma richiede un tempo lungo (1 3 mesi). È il fissatore più adoperato per il sistema nervoso.

Il liquido del Kleinenberg si forma in questo modo: si fa prima una soluzione satura d' acido pi-

crico, a cui s'aggiungeo gni 100$^{cm.c.}$ due centimetri cubici d'acido solforico; si filtra e ad ogni 5 parti di questa soluzione (d'acido picrico solforico) così formata, s'aggiungono 15 parti d'acqua distillata. È un ottimo fissatore specialmente per i pezzi embriologici: vengono bene le colorazioni nucleari; ma si richiede ricambiare molto alcool ordinario prima che i pezzi anatomici si spoglino completamente del color giallo che loro impartisce, e che altrimenti li rende refrattari alle colorazioni. L'immersione sufficiente per fissare i tessuti e di $^1/_2$ ora a 3 ore.

Liquidi induranti.

I pezzi anatomici che subirono solo la fissazione rimangono molli, e, onde possano essere facilmente tagliati, è necessario indurirli; ossia metterli a contatto di liquidi, che, senza sciuparli, tolgano loro poco per volta l'acqua, e possano così rimanere compatti e duri.

Tra i liquidi induranti metteremo senz' altro gli *alcool* ed il liquido del Müller.

Gli *alcool graduati* sono certamente più solleciti ed indispensabili alla disidratazione perfetta, (48 ore in alcool ordinario poi 24 in alcool assoluto).

Il *liquido del Müller* è ad un tempo ottimo fissatore ed indurante, ma, come sopra abbiamo notato, richiede un tempo larghissimo. Lo terrete caro per

conservare dei pezzi anatomici, da sottoporre poi ad altre manipolazioni, e sopratutto per il sistema nervoso centrale.

§. II.

Modo di fare i tagli.

Portati i pezzi anatomici per le consecutive manipolazioni fino nell' alcool ordinario, quivi possono rimanere più giorni e mesi senza più alterarsi ed essere sempre pronti ad ulteriori manipolazioni. Volendo ora fare dei tagli dei pezzi anatomici per poterli osservare al microscopio, questi tagli voi li potrete fare *a mano* con un rasoio ; ovvero con il *microtomo ;* prima però di fare questi tagli bisogna che mettiate il pezzo anatomico nell' alcool assoluto ove deve rimanere per almeno 24 ore perchè si disidrati bene e si indurisca.

a) Tagli a mano. Se non si richieda di fare dei tagli in serie regolare, e non molto fini, ci possiamo servire del rasoio. Saper fare dei buoni tagli a mano è cosa ottima per risparmiare tempo, dovendo fare un esame rapido ; come spesso succede, specialmente per i tumori, quando si voglia confortare della diagnosi microscopica una diagnosi clinica. Per ciò fare si tengono pronti nell' alcool allungato dei

pezzi di midollo di sambuco, oppure dei pezzi di fegato induriti nell' alcool; perchè se il pezzo anatomico è piccolo, s'incastra fra due pezzi di midollo di sambuco, ovvero fra due pezzi di fegato per poterlo tenere ben fisso fra le dita della mano sinistra. Allora immergendo di quando in quando la lama del rasoio nell'alcool ordinario, si fanno con questo, tenuto con la mano destra, dei tagli il più che sia possibile sottili.

b) Tagli *con il microtomo.*

Volendo avere tagli finissimi e regolari è necessario ricorrere al microtomo.

Il *microtomo* è uno strumento che porta una grossa lama di rasoio la quale si fa scorrere a mano in avanti ed in dietro; e di più porta una morsetta, con la quale si tiene fermo il pezzo anatomico, e che solo può avanzare dal basso all' alto mediante una vite micrometrica. Ora rimanendo la lama del rasoio sempre alla medesima altezza, fissata come è da una forte vite. ma scorrente sopra il pezzo anatomico in avanti ed indietro; come questo di poco venga spinto in alto dal movimento impresso alla vite micrometrica, resta tagliato in fettoline di quello spessore che si voglia, a seconda i giri fatti fare alla vite micrometrica.

Questo strumento è utile, perchè non si sciupa nessun taglio; perchè a seconda del passo di vite pos-

siamo misurare lo spessore del taglio; e perchè si possono fare tagli consecutivi seriati.

Ora però, ciò che si richiede per primo, per potere adoperare il microtomo, è di poter tener fisso il pezzo anatomico nella morsa; e per questo noi possediamo tre mezzi diversi:

1. Attaccare, mediante *colla* speciale, sopra un pezzo di sughero il pezzo anatomico.
2. Includerlo in celloidina.
3. Includerlo in paraffina.

§ III.

Metodo per fissare i pezzi anatomici al microtomo.

1. Il metodo di *attaccare i pezzi anatomici sul sughero mediante colla speciale*, non è certo il migliore; ma è comodo in talune contingenze, perchè è sbrigativo.

Si adopera a tal riguardo una *colla* così formata:

Colla di pesce	5
Glicerina	20
Acqua	10

Quando si deve adoperare si scalda alla lampada, finchè si fonde. Intanto il pezzo anatomico, che è nell'alcool ordinario si tiene almeno 24 ore nell' alcool

assoluto e da lì si prende e si asciuga bene con carta bibula. Appena asciugato si spalma con un pennello in un lato con detta colla e s'attacca sopra un pezzo di sughero. Appena solidificata la colla, il pezzo è pronto per essere inserito e tagliato al microtomo.

2. Il secondo metodo (inclusione in celloidina) è ottimo per il sistema nervoso in ispecie, e per tutte quelle preparazioni in cui è nociva una temperatura un poco elevata al disopra della normale.

Si richiede a questo scopo dell'alcool assoluto, dell'etere e della celloidina. (1)

I pezzi anatomici, provenienti dall'alcool ordinario debbono esser posti per 24 ore almeno in alcool assoluto; poi in una soluzione di etere e di alcool a metà pure per 24 ore; poi per altre 24 ore in celloidina sciolta in etere, in soluzione molto diluita (celloidina debole); e così ancora per altre 24 ore in celloidina molto densa, sciolta pure in etere, (celloidina forte). Su questa soluzione di celloidina forte i pezzi anatomici possono rimanere finchè si voglia, badando solo che l'etere non evapori.

Volendo tagliare al microtomo questi pezzi anatomici, basta estrarli dalla celloidina forte, dove sono; ed attaccarli con la stessa celloidina sopra un pezzo

---

(1) La celloidina è una varietà di nitrocellulosa, solubile in una mescolanza di alcool e di etere.

di sughero o su tavoletta apposita. Esposti così all'aperto l'etere evapora, ed appena che ne è evaporato abbastanza da rendere la celloidina un poco dura, s' immerge il pezzo anatomico, attaccato così al sughero od alla tavoletta, in alcool ordinario un poco allungato con acqua.

Su questo alcool i pezzi anatomici possono pure rimanere per lungo tempo, perchè, imbevuti di celloidina, non si alterano più e son sempre pronti, ogni qualvolta che si voglia, per essere inseriti sulla morsa del microtomo e tagliati.

3. Il terzo metodo (inclusione nella paraffina) (1), è la migliore delle inclusioni, per ottenere tagli finissimi, in serie, e ciò specialmente per studi embriologici.

Per fare quest'inclusione si richiede un *bagnomaria*, il quale è formato da una cassettina di metallo rettangolare, sorretta da quattro piedini, nella quale cassettina sono praticate tante incavature (3-4), dove si adattano dei piccoli recipienti (capsule) pure di metallo, entro le quali si pone a fondere la paraffina.

---

(2) La Paraffina, detta cera minerale, è una mescolanza di carburi d'idrogeno solidi, della formola generale $C^n H^{2n} + 2$, ottenuti per la distillazione dei petroli. Si detrae la paraffina dalla torba dei schisti bituminosi... È un corpo solido, bianco, fusibile fra 45° e 65°. Insolubile nell'acqua, solubile nell'alcool, nell'etere e nella benzina.

La cassetta si riempie d'acqua mediante un foro apposito, sormontato da un cilindro che funziona da valvola; e vicino alle capsule v'è un altro foro che serve per introdurvi un termometro centigrado.

I pezzi anatomici, anche per questa inclusione, provenienti dall'alcool ordinario, si pongono per 24 ore almeno in alcool assoluto, poi per 24 ore in xilolo od in benzina. Passate le 24 ore si scalda l' acqua del bagnomaria a *60°*, mediante fiamma di gas o di alcool e si sorveglia sempre perchè non cresca di più, (qualora non si abbia un termoregolatore).

Appena la paraffina è fusa si levano i pezzi anatomici dal xilolo, si asciugano bene con carta bibula, e s'immergono in uno dei recipienti contenenti paraffina, badando che questa li cuopra completamente. Qui si lasciano finchè il xilolo sia tutto evaporato, (almeno 3 ore) il che si sente all'odorato; e poi si trasportano nei recipienti vicini, per evitare che rimangano anche minime tracce di xilolo; il che sarebbe d'ostacolo ad una buona inclusione.

Dopo tre ore che i pezzi anatomici si trovano nella paraffina fusa a 60 c., si prende della paraffina ancora fusa, ma che non sia stata frammista con xilolo, e si versa in appositi recipienti metallici, detti *forme per la paraffina*, e che si potranno bene sostituire con piccole scatoline di carta di *2 a 4*$^{cm.c.}$ Le scatoline si bagnino prima con acqua e versata la paraf-

fina in esse vi si immergono poi i pezzi anatomici e si orientano nel modo che si crede migliore. Si finisce poi a riempire la scatolina con paraffina fusa, ed appena che comincia un poco a solidificarsi s'immerge per metà, la detta scatolina, nell'acqua fredda; affinchè la solidificazione della paraffina sia più rapida e regolare.

Quando la paraffina è fredda e solidificata si strappa la scatola di carta che vi rimane aderente, e si hanno così tanti cubetti di paraffina, entro cui sono immedesimati i piccoli pezzi anatomici.

A questo punto, qualora si vogliano fare dei tagli col microtomo, basta inserire un cubetto di paraffina solidificata, contenente il pezzo anatomico voluto, nella morsa del microtomo; e tutto è pronto per fare dei tagli microscopici.

§ IV.

Chiusura in balsamo del Canadà.

Allorchè i tagli istologici hanno subite tutte le manipolazioni, e sono stati bene *disidratati*, in luogo di porli in liquidi acquosi per conservarli (come sopra abbiamo visto), si possono chiudere, dopo d'averli posti nei liquidi rischiaratori, in una goccia di balsamo sciolto in xilolo. Questo balsamo nello stesso tempo,

che fa da liquido conservatore, fa da mastice di chiusura, poichè esso stesso, consolidandosi alla periferia del portaoggetti, proibisce l'ulteriore evaporazione del xilolo e mantiene così inalterate le preparazioni microscopiche.

Supponete ora di avere dei pezzi anatomici pronti tutti per essere tagliati col microtomo, e manipolati in diversa maniera; cioè dei pezzi anatomici attaccati semplicemente con la colla su pezzi di sughero; dei pezzi inclusi in celloidina, e dei pezzi inclusi in paraffina (vedi sopra pag. 39). Vi resta ora a sapere come procedere per la disposizione dei tagli sopra i portaoggetti, per la loro colorazione, per la disidratazione, per il loro rischiaramento e per la chiusura; ma di tutto questo ne parlaremo partitamente in ognuno dei processi diversi che voi potrete tenere a secondo dell'inclusione fatta.

Bisogna premettere però che per progredire in avanti nel vostro studio vi abbisognano adesso ancora altri attrezzi ed altri reagenti; come, delle *capsuline* o dei *vetri da orologio* di diversa grandezza; delle *vaschette di vetro*, comode per contenere un portaoggetti. Di più *due spatoline* di diversa grandezza, e poi come al solito *due aghi*, *una pinza*, *un pajo di forbici* ed infine *delle bacchet tine di vetro*.

Vi saranno inoltre necessarî altri reagenti: *acqua distillata — alcool ordinario — alcool assoluto —*

liquidi coloranti — olio di garofani — balsamo sciolto in xilolo.

b) Dei liquidi coloranti.

Troverete di liquidi coloranti una quantità, ma quelli che vi potranno servire ottimamente per ogni caso sono i seguenti:

1. Liquido di Zihel;
2. Bleu di metilene;
3. Carminio alluminoso (Pisenti);
4. Soluzione all'1 per $^0/_0$ d'ac. picrico (acquoso);
5. Ematossilina di Ehrlich;
6. Soluzione d'eosina all'1 per 100 (acquosa).

Con questi liquidi coloranti potrete fare colorazioni semplici e doppie, alcune delle quali possono avere il valore di vere reazioni microchimiche.

1. Il *liquido di Zihel* l'otterrete in questo modo, unendo insieme cioè:

Fucsina gr. *uno*;
Alcool assol. gr. *dieci*.
Ac. fenico cristallizzato gr. *cinque*;
Acqua distillata gr. *cento*.

Del bleu di metilene ne farete una soluzione acquosa all'uno per cento.

Per avere *il carminio alluminoso* (Pisenti) farete bollire due grammi di carminio per qualche minuto

in 100 centimetri cubici della soluzione d'allume satura a caldo: aggiungerete poi due grammi di solfato di soda, continuando a riscaldare per 5'. Filtrate il tutto a caldo.

L'*ematossilina di Ehrlich* la preparerete così:

Ematossilina gr. *uno*;

Alcool assoluto gr. *cinquanta*; ed a questo aggiungerete:

Glicerina gr. *cinquanta*;

Acido acetico centigr. *cinquanta*;

Acqua distillata gr. *cinquanta*,

e tutto si saturi con allume in eccesso.

Ciò fatto si sottragga questo liquido dalla luce per due o tre settimane e poi si filtri.

Modo di adoperare queste sostanze coloranti.

Si pongano i liquidi in discorso in relative bacinette di vetro versandovi in ognuna separatamente le soluzioni colorate che si devono tenere sempre pronte in bottiglie etichettate.

Però per avere la soluzione colorante di bleu di metilene si deve prima porre in una delle bacinette una soluzione acquosa all'1 per 10,000 di potassa ed in questa si debbono mescolare cinque o sei goccie della soluzione all'uno per 0|0 di bleu di metilene.

Così tutto disposto si possono fare semplici colorazioni e doppie colorazioni.

Per le semplici colorazioni basta portare i tagli dall'alcool ordinario in uno dei liquidi coloranti che si voglia, e tenerveli per quattro o cinque minuti primi: poi lavarli in acqua e quindi portarli in alcool ordinario, alcool assoluto, etere o xilolo, olio di garofani, e chiuderli in balsamo.

Volendo fare doppie colorazioni le migliori combinazioni di colori sono:

1. Il liquido di Zihel con il bleu di metilene (10 minuti nel liquido di Zihel; e 5 minuti nella soluzione potassica di bleu di metilene);

2. La soluzione potassica di bleu di metilene con l'eosina all'uno per cento (nel bleu dieci minuti, nell'eosina tre o quattro minuti).

3. Il carminio alluminoso Pisenti, con la soluzione all'uno per cento di acido picrico; in modo da formare un picrocarminio (nel liquido Pisenti una o più ore, nell'acido picrico da 5' a 10'). Questa doppia colorazione può farsi anche sui tagli che erano stati antecedentemente colorati *in toto* (vedi pag. 50) con il carminio alluminoso Pisenti.

Dopo colorati i pezzi debbono portarsi a lavare in acqua distillata e poi in alcool ordinario dove deve avvenire la differenziazione, e dove si devono tenere finchè non esca più colore in massa.

Differenziati bene i tagli si pongano in alcool assoluto e da questo in etere od in xilolo a seconda l'in-

clusione che si era fatta, cioè a seconda se provenienti dalla inclusione in celloidina o dalla inclusione in paraffina; e rischiarati si chiudano in balsamo. Però per il procedimento regolare si guardi appresso il capitolo relativo.

§ V.

Processo da tenersi per far tagli di pezzi anatomici attaccati sul sughero semplicemente con colla.

Terrete pronto a questo riguardo:

Una capsula con acqua;
id. con alcool ordinario;
id. con sostanze coloranti;
id. con alcool assoluto;
id. con olio di garofani;
e del balsamo sciolto in xilolo.

Posto il pezzo anatomico al microtomo ne farete dei tagli il più che vi sia possibile sottili, tenendo sempre inumidita la lama del rasoio, mediante un pennello imbevuto di alcool ordinario. Questi tagli, mano mano che li venite facendo, li porrete nella capsula dove è contenuto l'alcool ordinario: da qui li passerete poi a colorare (vedi pag. 43). Colorati che siano, lavateli bene in acqua e passateli poi in

alcool ordinario, e quindi almeno per 5' in alcool assoluto. Disidratati così, portateli a rischiarare nell'olio di garofani per 5'. Giunti a questo punto non vi resta che disporre i tagli sul portaoggetti, asciugarli bene con carta bibula, e chiuderli in balsamo. In tal modo la preparazione può essere conservata per lungo tempo.

§ VI.

Processo da seguirsi per i pezzi anatomici inclusi in celloidina.

Per questo processo vi abbisognano:
Una capsula con alcool ordinario;
id. con alcool assoluto;
id. con etere;
id. con liquido colorante;
id. con olio di garofani;
id. con balsamo.

I tagli che farete col microtomo, pure tenendo bagnata sempre la lama con alcool ordinario, li porrete primo nell'alcool ordinario; dall'alcool ordinario all'alcool assoluto per 5' almeno; dall'alcool assoluto nell'etere; finchè venga sciolta tutta la celloidina. A questo punto tornerete indietro ripassandoli in alcool assoluto prima e poi in alcool ordinario. Da qui si passino alla

colorazione semplice o doppia (vedi sopra), e lavati bene e disidratati, si pongano nell'olio di garofani, che in questo caso, oltre a servirvi come rischiaratore, serve anche a togliere la celloidina, che ancora vi fosse rimasta, essendo pure un dissolvente della medesima. Disposti quindi i tagli sul portaoggetti si asciughino e si chiudano in balsamo.

§ VII.

Processo da seguirsi per i pezzi anatomici inclusi in paraffina.

Per questo caso terrete pronti:

Una lampada a spirito;
una soluzione d'albumina (Fol);
una vaschetta con xilolo;
id. con alcool ordinario;
id. con alcool assoluto;
id. con il liquido colorante;
id. con acqua.

La *soluzione d'albumina* detta di Fol, la preparerete in questo modo: prendete un albume d'uovo e sbattetelo fino a neve dentro una soluzione di salicilato di soda; lasciate depositare, filtrate ed a questo filtrato aggiungete un volume eguale di glicerina, e di più una piccola presa di salicilato di soda.

Avendo pronta l'albumina, prendete un portaoggetti, pulitelo bene, e fatevi cadere sopra una goccia dell'albumina suddetta, che spanderete bene sopra il vetro, strisciandovi sopra con il dito pollice da lasciarne uno stratarello sottilissimo.

A questo punto incominciate subito i tagli al microtomo con la lama asciutta (ossia non bagnata, come per gli altri casi con alcool ordinario), e questi tagli disponete mano mano e ordinatamente, sul portaoggetti preparato, sopra il sottile strato di albumina. Premendo con il dito fateli bene aderire.

Passate rapidamente tre o quattro volte alla fiamma ad alcool questo portaoggetti: allora la paraffina si fonde e nello stesso tempo l'albumina coagulandosi fa sì che i piccoli tagli rimangano fortemente aderenti al portaoggetti, da permettere francamente tutte le ulteriori manipolazioni.

Il portaoggetti così caldo immergetelo nella capsula contenente xilolo, allo scopo di togliere completamente la paraffina che per caso fosse ancora rimasta.

Dal xilolo porterete il portaoggetti con i tagli aderenti nell'alcool assoluto; da qui nell'alcool ordinario; e quindi alla colorazione semplice o doppia (vedi sopra). Colorati i tagli, si lavino, si disidratino e si chiudano in balsamo.

§ VIII.

Colorazione *in toto*.

Per i pezzi specialmente da includere in paraffina è molto comodo farne prima la colorazione *in toto*, e ciò vi farà risparmiare tempo ed alcool.

Vi servirete in questo caso del carminio alluminoso *Pisenti*, (vedi p. 44).

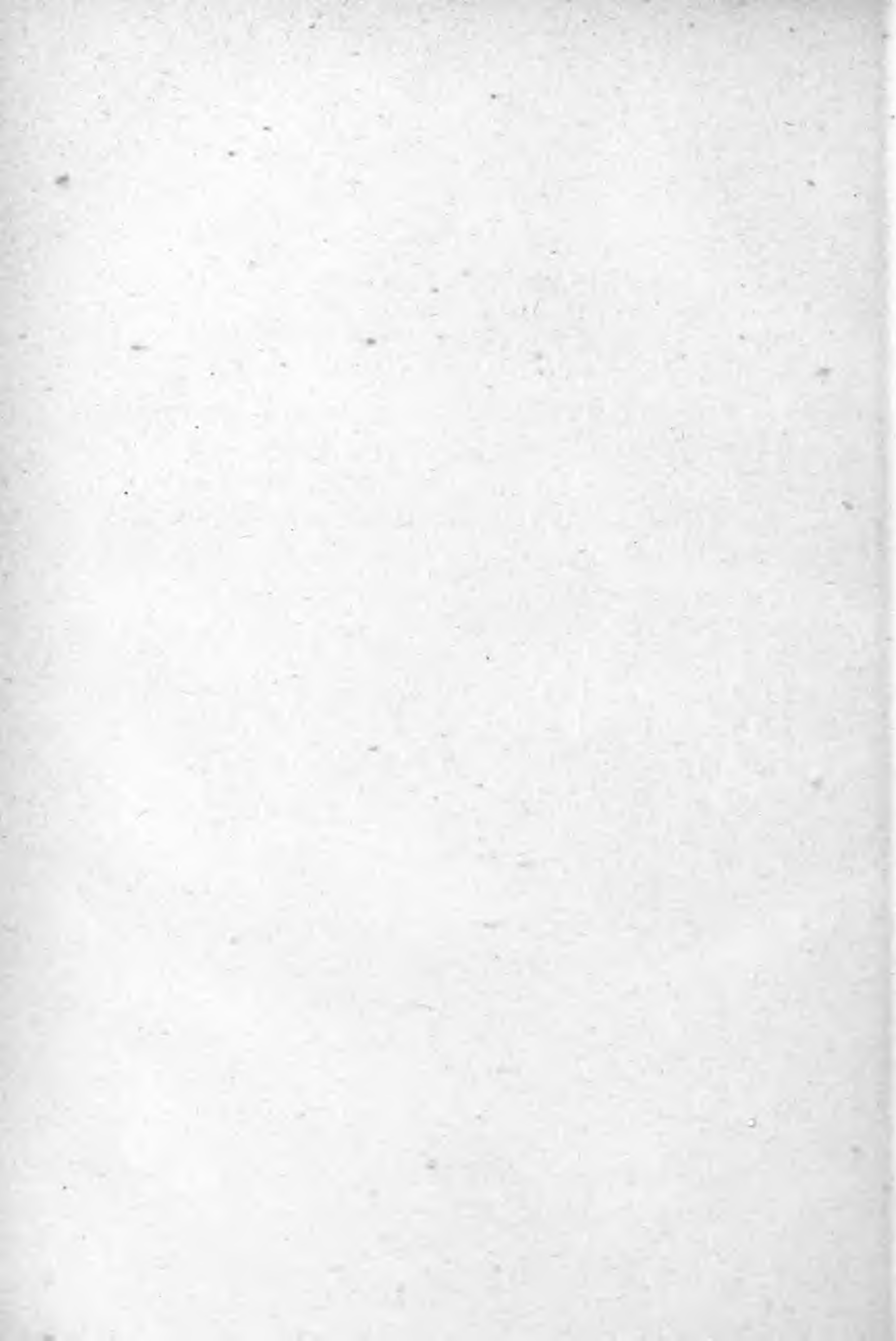
Per fare questa colorazione *in toto* bisogna fissare i pezzi con alcool assoluto, passarli poi per due o tre giorni in alcool ordinario e poi nel liquido colorante, per 24 o 48 ore: fino a che cioè, facendo dei piccoli tagli per saggio, non si vegga che il colore sia bene penetrato uniformemente in tutto il pezzo. Allora si pongano a decolorare in alcool ordinario acidulato con qualche goccia d'acido cloridrico 1 : 400 e finchè l'alcool, che si deve ricambiare almeno ogni 24 ore, non rimanga chiaro. Dopo ciò s'induriscano i pezzi, così colorati, in alcool assoluto, e s'includano secondo l' ordinario, in paraffina. I tagli che se ne faranno, attaccati coll'albumina, privati della paraffina, non richieggono che di essere rischiarati e chiusi in balsamo.

§. IX.

Metodo per fare iniezioni colorate a freddo.

Molto comoda è l'iniezione a freddo con una soluzione di bleu di Prussia. Questa sostanza colorante, essendo composta di granuli finissimi, insolubili nell'acqua, si deposita dentro i vasi e ne descrive il decorso. La massa da iniettare si compone di:

Bleu di Prussia	3
Acqua distillata	100

Si fa l'inezione per l' arteria dell' organo che si vuole iniettare; ed appena iniettato se ne fanno dei piccoli pezzi, grossi quanto un fagiuolo all' incirca, e postili in alcool ordinario, vi si lasciano come provvista per tempo indefinito; tornerà opportuna per sezioni microscopiche.

PARTE III

METODI SPECIALI.

§. I.

Cariocinesi.

Per l' osservazione delle figure cariocinetiche si richiede tutta una tecnica speciale, qualora queste figure si vogliano ritrovare nelle cellule dei tessuti: e prima di tutto è necessario un materiale freschissimo; poi, che questo materiale venga subito e bene fissato; ed infine che si abbiano liquidi coloranti adattati a questo scopo.

Come liquido fissatore è ottima la *miscela-osmio-cromo-acetica* di Flemming, che è così composta:

Ac. cromico	2,5 %	— 25
ac. osmico	1 %	— 10
ac. acetico	1 %	— 10
acqua		— 550

Soggiorno dei pezzi nel liquido fissatore da 1 a 3 ore; lavaggio in acqua distillata da 3 a 6 ore; indurimento negli alcool graduati per 3 a 4 giorni; inclusione; rischiaramento in garofani; chiusura in balsamo. Però è buono anche come fissatore il *liquido del Kleinenberg*, di cui già conoscete la formola (vedi sopra). Vi porrete i pezzi freschissimi, appena cioè tolti dall' animale vivisezionato, e ve li farete stare almeno per tre ore.

Lavati poi bene in acqua teneteli in alcool ordinario finchè sia bene tolto l'eccesso di acido picrico in modo che l'alcool continuamete rinnovato non si colori più in giallo; così decolorati, s'induriscano in alcool assoluto e quindi s'includano in paraffina.

Come liquido colorante sceglierete la *saffranina*. Colorazione per 10' a 12 ore in una soluzione acquosa di saffranina all'1 %.

Quindi lavaggio in alcool ordinario, acidificato con acido cloridrico (1 per 400), per fissare bene il colore; poi lavaggio in alcool assoluto finchè i tagli si disidratino bene; ed infine olio di garofani e chiusura in balsamo.

La colorazione con la saffranina è la migliore perchè fa risaltare subito all' occhio le figure cariocinetiche; giacchè i nuclei in riposo si colorano molto pallidamente, ed invece i nuclei in cariocinesi si colorano assai intensamente.

Questo metodo, ora esposto vi servirà bene per potere scoprire se vi sono figure cariocinetiche nei tessuti che vorrete osservare. Che se però a voi piace studiare la cariocinesi per vederne tutte le sue diverse fasi, allora vi sarà necessario ricorrere ad un materiale molto più sicuro ed adatto, che voi troverete facilmente prendendo la *milza del tritone* o della *salamandra acquatica.*

Terrete pronto a questo riguardo una *soluzione acquosa di verde di metile*, così composta:

Verde di metile	gr.	0,50
Acqua distillata	»	100

Di questa soluzione ne porrete una goccia sopra il portaoggetti, ed allora estratta con sveltezza la milza del tritone e della salamandra, ne dissocierete un pezzetto in questa goccia di verde di metile e copertala, l'osserverete nel microscopio. Volendola poi conservare aggiungerete una goccia di cloruro di sodio a 0,75 °/₀ e la chiuderete col mastice.

Così, con poca fatica, si potranno osservare da voi tutte le forme cariocinetiche, di cui è ricchissima la milza di questi animali; ed ancora ben distinte; essendo i nuclei cellulari della polpa splenica del tritone e della salamandra molto grossi.

§ II.

Sangue.

Avete già studiato in preparati volanti tutti gli elementi isolati che costituiscono il sangue ora vi resta a conoscere il modo di farne preparazioni permanenti; ed i rapporti in cui si trovano tra loro gli elementi medesimi.

Anche per questo tessuto liquido petrete fare delle preparazioni permanenti: *a)* umide; *b)* a secco.

1. I liquidi migliori conservatori del sangue a fresco sono: il *miscuglio del Pacini;* il *liquido di Hayem;* il *sierojodato*; le *soluzioni di cloruro di sodio.*

Il *liquido del Pacini* è così formato:

Bicloruro di mercurio	2
Cloruro di sodio	4
Glicerina	26
Acqua distillata	226

Questo liquido prima di adoperarlo si diluisce con due parti di acqua distillata.

Volendo fare un preparato di sangue, si deve ben pulire il tratto di pelle dell'animale che deve essere punto; e su questo disporre una buona goccia del liquido conservatore. Allora fatta la puntura il sangue

appena esce si mescola con il detto liquido, e le forme corpuscolari ne rimangono fissate per non più alterarsi. La goccia di sangue così diluita si depone sul portaoggetti, si cuopre e si chiude col metodo solito della colofonia (vedi sopra). Oppure anche si può far seccare con modico calore deporvi poi un' altra goccia del liquido preparato e chiuderlo.

Come col liquido del Pacini si può fere con gli altri liquidi conservatori.

2. Per le preparazioni del sangue a *secco*, il *metodo migliore è quello di Ehrlich*.

Si pone una goccia di sangue direttamente sopra un coprioggetti, si copre con un secondo coprioggetti, e dopo che si é distesa, si allontanano (afferrandoli con pinzette) i due coprioggetti l' uno dall'altro.

Appena il sangue così disteso è disseccato all'aria, si riscalda a 120° per parecchie ore, ovvero si tiene per tre ore in alcool assoluto ed etere a metà. Quindi si pone a colorare in una soluzione acida di ematossilina ed eosina di Ehrlich per una o due ore; si lava bene in acqua, si asciuga perfettamente e si chiude in una goccia di balsamo.

Allora vedrete colorati in violetto più o meno intenso i nuclei dei leucociti mononucleati, dei leucociti polinucleati, dei linfociti; mentre il protoplasma dei leucociti e le emazie vedrete colorati in rosso;

così parimenti colorate in rosso le granulazioni eosinofile.

Con questo metodo voi potrete conoscere le diverse specie di cellule bianche che fanno parte del sangue, e le granulazioni differenti che queste contengono: e ciò é di grande utilità per la patologia del sangue.

Secondo Ehrlich nel sangue si trovano:

a) i piccoli linfociti, un poco più piccoli dei corpuscoli rossi, e con grande nucleo, provenienti dai gangli linfatici;

b) grandi linfociti, due o tre volte più grandi delle cellule rosse e con nucleo grande; (gangli linfatici);

c) gli elementi mononucleari o forme di passaggio, che si distinguono dai grandi linfociti per il nucleo, che possiede nel mezzo un'insenatura (milza? midollo osseo?).

d) leucociti polinucleari, con nucleo polilobato, o con parecchi nuclei, intensamente colorabili e che rappresentano il 70 % di tutte le cellule bianche del sangue ed hanno la capacità d'emigrare. (Milza? Midollo osseo?)

e) cellule eosinofile nelle quali il nucleo si colora meno intensamente di quello dei leucociti polinucleari; e le granulazioni che esistono nel protoplasma si colorano con l'eosina in rosso intenso (provenienti dal midollo osseo).

Ora, a proposito delle cellule eosinofile, dobbiamo dire che Ehrlich, oltre che ha dimostrato le diverse forme delle cellule bianche (leucociti), ha segnalato in queste cellule stesse granulazioni di diversa natura, che si comportano cioè differentemente a contatto di determinate sostanze coloranti di anilina. Secondo questo loro modo diverso di comportarsi, egli stabilì 5 diverse specie di granulazioni, che distinse con le lettere, α β γ δ ε.

Cioè α = eosinofile ; β = anfofile ; γ = basofile ; δ = basofile ; ε = neutrofile.

Le più importanti sono le cellule eosinofile (α), quelle cioè i cui granuli si colorano intensamente con i colori di anilina acidi e specialmente con l'eosina. Queste granulazioni nel sangue normale sono rare, aumentano nella leucemia.

Le granulazioni basofile (γ e δ); si colorano con gli ordinari colori d'anilina basici (bleu di metilene, verde di metile basico): esse sono assai rare nel sangue normale dell'uomo, frequenti nel sangue leucemico.

Le *granulazioni neutrofile* (ε), si colorano con i colori neutri d'anilina ; esse si trovano ammassate nell'interno dei leucociti polinucleati, cioè in quelle forme di leucociti che nell'infiammazione emigrano. Questi rappresentano la parte principale dei corpuscoli bianchi del sangue normale ; ed il *pus* consta

in massima parte di questi leucociti. Nella leucemia non aumentano i leucociti polinucleati. (Vedi *Tecnica* di Kahlden, tradotta dal Dr. Cirincione ; con note di Armanni. Edit. Pasquale, Napoli).

Metodo del Biondi.

Il Biondi poi ha dato un metodo col quale è possibile includere il sangue e farne delle sezioni col microtomo. Ecco il metodo in parola :

Si mescolino alcune gocce di sangue con 5$^{cm.c.}$ di una soluzione al 2 % d'acido osmico, e s'agiti. Dopo 24 ore si prendano con una pipetta una o due gocce della soluzione e si portino in 5$^{cm.c.}$ di agar-agar, che liquefá a 35° o 37° gradi C. : indi si versa l'agar in scatoline di carta e s'indurisce in alcool a 85°. Se ne facciano poi le sezioni, che possono anche essere colorate con l'anilina, la quale colora pure l'agar ; ma poi questa colorazione dell'agar viene tolta dall'alcool e rimane colorato solo il sangue. Come rischiarante si adoperi il creosoto, e si chiudano in balsamo.

Enumerazione dei globuli rossi e determinazione quantitativa dell'emoglobina.

Il sangue dell'uomo normale, secondo Vierordt, contiene 5 milioni di corpuscoli rossi in un millimetro cubico di sangue.

Ora i corpuscoli rossi nello stato patologico possono diminuire molto di numero (oligocitemia); come pure, rimanendo normale il numero, può diminuire la quantità d'emoglobina (oligocromemia).

Per riconoscere questo stato patologico si sono costruiti diversi apparecchi, di cui gli uni hanno per iscopo di numerare direttamente i corpuscoli che si trovano nel sangue (contaglobuli di Thoma-Zeiss); gli altri di calcolare l'emoglobina contenuta nel sangue (cromocitometro di Bizzozero ed Emometro di Fleischl).

Il *contaglobuli di Thoma-Zeiss* è costituito essenzialmente di una piccola camera di vetro, che è saldata sopra un portaoggetti ed ha un millimetro di profondità; il cui pavimento è diviso in quadrati di 1/4000 mm. c. Si pone quivi una goccia di sangue misurata con una pipetta speciale, e si diluisce con una quantità determinata di cloruro di sodio al 3 %. Si copre questa goccia diluita di sangue e posta nella cameretta di vetro, con un vetrino coprioggetti si osserva al microscopio cercando di contare il numero dei corpuscoli contenuti in uno dei quadrati in cui è diviso il fondo della suddetta cameretta di vetro.

Questo numero trovato si moltiplica per 4000 se il sangue è normale; e, se il sangue venne 100 o 200 volte diluito, si deve moltiplicare per 100 o per 200 ancora per sapere il numero dei corpuscoli rossi in 1 mm.c.

I corpuscoli rossi c' interessano per la funzione respiratoria, ed in questa essi agiscono non già per il numero degli elementi, ma per la quantità di emoglobina che contengono. E siccome nelle gravi anemie e nelle clorosi il numero dei globuli può essere normale, ed invece essere il sangue poverissimo d'emoglobina, per questo si sono costruiti altri strumenti, con i quali si possa constatare la ricchezza in emoglobina: e questi strumenti sono appunto il cromocitometro del Bizzozero, e l'emometro di Fleischl.

Il *cromocitometro del Bizzozero* è formato da due cilindri, chiusi con un vetro ad una delle estremità, e di cui uno si possa introdurre esattamente nell'altro, come il tubo di un cannocchiale. Lo spessore che rimane fra i due vetri di detti tubi viene riempito dal sangue da esaminare, e che può variare colla qualità del sangue. La misura di questo spessore è determinata da un'apposita scala graduata.

1. Adoperato l' istrumento come *citometro*, il sangue viene semplicemente mescolato con una determinata quantità (1.50) di soluzione di cloruro di sodio a 0.75 °/₀, che non ne altera i globuli (Sangue parte 1; cloruro di sodio a 0,75 °/₀ parti 50).

2. Se l'istrumento si vuole adoperare come *cromometro*, il sangue viene diluito con una determinata quantità d'acqua (sangue$^{mm.c.}$ 10; acqua distillata gr. 0.50); la quale scioglie l'emoglobina e quindi il liquido, pur rimanendo colorato, diventa trasparente.

Adoperato come *citometro* la ricchezza emoglobinica del sangue si deduce dallo spessore che devesi dare allo strato di sangue nello strumento, per poter vedere appena appena distinti i $^3/_4$ di una fiamma di una candela posta in una camera buia, ad un metro e mezzo di distanza dallo strumento.

Adoperato come *cromometro* la ricchezza emoglobinica si deduce dallo spessore che devesi dare allo strato di sangue, perchè la sua intensità di colorazione sia eguale a quella di un vetro campione colorato, che fa parte dello strumento.

Ognuno di questi strumenti deve essere dapprima graduato con un sangue normale: quindi sarà facile di farne il rapporto per ogni esame.

Emometro di Fleischl.

Il principio di questo strumento riposa su ciò che il colore del sangue, esaminato sciolto nell'acqua, viene paragonato col colore di un prisma di vetro, colorato in rosso con la porpora di Cassius. La parte essenziale dell'apparecchio è dunque il prisma di vetro.

Questo prisma porta una scala che lo divide da 10 in 10 parti, dalla base fino al tratto dove il suo spessore è *O;* e questa scala è segnata con i numeri 100, 90, 80...

Tutto l'apparecchio è simile ad un piccolo microscopio per dissezioni; e perciò ha un tavolo forato

nel mezzo per il passaggio dei raggi, projettati da uno specchio di gesso che si trova al disotto di esso e che riceve la luce da una lampada.

Al disopra del foro del tavolo è fissata una piccola vaschetta cilindrica di vetro, e che è divisa esattamente in due parti da un diaframma.

Al disotto invece del tavolo, ed incastrato in esso, vi è una specie di cassetto che può scorrere liberamente da un lato all'altro; questo cassetto porta fissato il prisma di vetro colla sua scala relativa.

Questo prisma poi è situato in modo da potersi vedere al disopra del tavolo solo attraverso una metà della vaschetta.

Ora riempite di acqua esattamente le due metà della vaschetta di vetro: in quella parte corrispondente al prisma si vedrà l'acqua colorata per il prisma che vi giace sotto; nell'altra invece l'acqua avrà il suo colore normale.

Mediante una pipetta (inerente all'istrumento) si deve ottenere una misura *normale* di sangue, capace a poter dare all'acqua, contenuta nell'altra parte della vaschetta, una colorazione identica a quella che si vede per trasparenza nell'altra metà: essa è dovuta al prisma sottoposto, e collocato appositamente in corrispondenza al numero *100* della scala.

Graduata così la pipetta, volendo fare un esame della quantità d'emoglobina nel sangue di un indi-

viduo malato, si riempieno prima egualmente di acqua le due metà della vaschetta; si fa poi una puntura su un dito di questo individuo, e si prende tanto sangue, che corrisponda alla misura segnata nella pipetta. Questo sangue si scioglie nell'acqua contenuta nella metà della vaschetta non corrispondente al disopra del prisma. Si faccia scorrere al disotto allora il prisma di vetro fino al punto da vedere identicamente colorata tutta l'acqua della vaschetta; e a questo punto si legga nella scala il numero che vi corrisponde. Se si trova ad esempio che il prisma si è dovuto spostare fino al numero *60*, è segno che il sangue esaminato contiene il 60 per 100 d'emoglobina.

§ III.
Centri nervosi.

a) METODO GOLGI — REAZIONE CROMOARGENTEA.

Per lo studio del sistema nervoso avrete bisogno di una tecnica tutta a parte; giacchè non è sufficiente una semplice colorazione, ma son necessarie reazioni microchimiche speciali.

Prima della scoperta del metodo di Golgi colla reazione cromoargentea, si sapeva poco sulla fina istologia del sistema nervoso centrale, ed a Golgi

dobbiamo tante conoscenze riguardo alla forma ed ai rapporti delle cellule nervose e di nevroglia.

Con questa reazione noi vediamo la forma cellulare, i diversi prolungamenti della cellula nervosa, l'andamento del cilindrasse e la rete nervosa che ne deriva.

Per riuscire più facilmente ad ottenere questa reazione cromoargentea specifica per le cellule nervose e loro derivati, è bene di procedere nel modo seguente:

1. Fissare ed indurire contemporaneamente i pezzi (il più che sia possibile freschi) in una soluzione osmiobicromica; composta di

Acido osmico, soluzione all'1 per 100, parti 2;
Liquido del Muller, parti 8.

In questa soluzione si debbono riporre i pezzi, e tenerli sempre all'oscuro, per non meno di 7 giorni.

2. Lavaggio in acqua distillata per 10'.

3. Si pongano i pezzi in un bicchiere a calice, con la soluzione di nitrato d'argento, al 1[2 per 100, e si rinnovi questa soluzione finchè rimanga limpida. Si ponga allora all'oscuro e si rinnovi il liquido ogni giorno, almeno per sette giorni di seguito. I pezzi anatomici saranno arrivati e pronti per i tagli, appena abbiano presa una colorazione *marrone oscura*. A questo punto si faranno dei saggi, e fino a che non si vede che le cellule siano bene disegnate in nero, si se-

guitano a tenere i pezzi nel bagno d'argento. In generale dopo il settimo giorno la reazione è quasi sempre avvenuta.

4. Avvenuta la reazione si facciano tagli a mano e si rischiarino con *creosoto*.

5. Si asciughino bene i tagli dal creosoto con carta bibula, e vi si ponga sopra uno strato di balsamo, senza apporvi però il vetrino coprioggetti, e si lascino asciugare.

Con il metodo Golgi voi non potrete però vedere la struttura intima della cellula; e perciò bisogna che ricorriate ad un altro processo di colorazione, per vedere bene anche il nucleo e nucleolo non che la struttura del protoplasma cellulare. A questo riguardo il metodo migliore è quello di Löffler.

b) Metodo di Löffler per la colorazione delle cellule nervose.

1. Fissazione dei pezzi di cervello o di midollo spinale, con alcool assoluto o con il liquido di Kleinenberg (3-4 ore).

I pezzi provenienti dal liquido di Kleinenberg debbono essere prima spogliati bene dell'acido picrico, tenendoli in alcool ordinario, che verrà spesso rinnovato, per più giorni.

2. Colorazione, in una soluzione di potassa all'uno per diecimila, dove siano state poste alcune

gocce della soluzione alcoolica concentrata di bleu di metilene. Immersione da 10' fino a 24 ore, secondo l'intensità colorante.

3. Decoloramento per 10 fino a 30 secondi in una soluzione d'acido acetico a 0,5-1 %.

4. Disidratamento negli alcool graduati.

5. Rischiaramento in olio di garofani (10').

6. Chiusura in balsamo.

Si può anche ottenere una doppia colorazione con una soluzione acquosa, all'1 % di eosina.

Questi due metodi esposti vi pongono al caso di studiare bene la cellula nervosa, ma volendo conoscere il decorso delle fibre nervose midollate è necessario che ricorriate ad altri metodi di colorazione specifica. Voi sceglierete a questo riguardo il metodo Weigert modificato da Pal.

c) Metodo Weigert-Pal per la colorazione specifica delle fibre midollate.

1. Indurimento e fissazione dei pezzi di cervello o di midollo spinale nel liquido del Müller, per uno a tre mesi.

2. Colorazione nella soluzione d'ematossilina di di Weigert per 24 a 48 ore; eventualmente un'ora nella stufa. Questa ematossilina è così composta:

Ematossilina 1.
Alcool 10.

Acq. distill. 90.
Carbonato di litina 1-3.

3. Lavaggio dei tagli colorati in acqua distillata, con l'aggiunta di carbonato di litina 1 : 2 0[0 ; i tagli devono prendere un colore bieu carico.

4. Passaggio dei tagli in una soluzione 0,25 0[0 di permanganato di potassa, per 20 a 30 secondi ; finchè tutta la sostanza apparisca gialla.

5. Passaggio in una soluzione di:
Acido ossalico puro 1
Solfito potassico 1
Acqua distillata 200, per pochi secondi.

6. Lavaggio prolungato in acqua distillata (10' a 15').

7. Passaggio negli alcool graduati.

8. Rischiaramento in xilolo (5' a 10).

9. Chiusura in balsamo.

Questo metodo ha il vantaggio su quello di Weigert, per essere molto più rapido ; per le immagini nettissime che ne risultano ; e perchè si adatta bene per una doppia colorazione, risultando tutto il tessuto che sta tra le fibre nervose colorate, completamente scolorato, e quindi atto a prendere un'altra colorazione.

La migliore colorazione consecutiva è quella col picrocarminio o col carminio boracico, o rosso di Magdala.

2. — Sistema nervoso centrale degli animali inferiori.

Volendo studiare il sistema nervoso centrale dei piccoli vertebrati come pure degli altri animali inferiori, è assolutamente necessario, per aver tagli in serie, e per potere maneggiare comodamente questi piccoli centri nervosi, *ricorrere all'inclusione alla paraffina*. Quest'inclusione è pure applicabile per il metodo alla Weigert e per il metodo alla Golgi e si richieggono solo alcune cautele.

Ecco come io procedo:

a) Inclusione in paraffina dei pezzi dei centri nervosi e trattamento col metodo di Weigert.

I piccoli cervelli o midolli spinali che sono già stati per un mese almeno nel liquido del Müller li pongo nella soluzione satura di acetato di rame allungata per metà d'acqua distillata, e li tengo per 3 o 4 giorni nella stufa a 38 c. Li lavo quindi bene in acqua distillata e li passo negli alcool, tenendoli 24 ore in alcool ordinario, e 24 ore in alcool assoluto.

Dall'alcool assoluto li porto in xilolo dove li tengo per otto o dieci ore al più.

Preparato il bagnomaria per la paraffina a 45° c. immergo nella paraffina fusa i piccoli cervelli provenienti dal xilolo, dopo d'averli bene asciugati dal xilolo con carta bibula.

Nel bagno di paraffina fusa non debbono rimanere più di un'ora, e la temperatura non deve superare i 55° c.

Inclusi in paraffina i piccoli cervelli e midolli spinali, appena questa è solidificata e fredda, ne faccio dei tagli in serie e li dispongo in buon numero ed in ordine nel vetrino portaoggetti, attaccandoveli col solito metodo ordinario dell'albumina.

Tolta bene la paraffina che includeva i piccoli tagli, con il calore di una lampada a spirito e poi con un bagno in xilolo, porto il vetrino in alcool assoluto, poi in alcool ordinario per pochi minuti, e finalmente in un bagno di ematossilina alla Weigert. In questa ematossilina debbono restarvi almeno per 24 ore. Passate le 24 ore, lavo con precauzione in acqua distillata i vetrini con i tagli aderenti, ed ora colorati fortemente con l'ematossilina.

Passo poi questi nella soluzione decolorante di prussiato, che è così composta:

Borato di soda	2,00
Ferricianuro di potassio	2,50
Acqua distillata	200,00

In questo decolorante debbono restare pochi minuti si debbono levare appena incominciano leggermente a differenziarsi.

Quindi ritorno a lavare in acqua distillata per 10' ; poi li passo in alcool ordinario per 5' ; poi in alcool assoluto per 5' a 10' ; e finalmente in xilolo. Rischiarati bene in xilolo, li tolgo da esso e li asciugo perfettamente con carta bibula. Asciugati vi faccio cadere subito sopra diverse goccie di balsamo sciolto un poco in xilolo, da farne al disopra uno strato omogeneo ; e *senza apporvi il vetrino coprioggetti*, lascio così asciugare il balsamo che deve funzionare da coprioggetti. Le preparazioni così chiuse non si alterano più, ciò che invece non succederebbe se vi si apponesse sopra il coprioggetti.

b) Inclusione in paraffina di piccoli cervelli o midolli spinali trattati col metodo Golgi colla reazione cioè cromoargentea.

I piccoli cervelli o midolli spinali che hanno già subita la colorazione cromo-argentea alla Golgi (vedi sopra), debbono essere lavati in acqua e poi bene induriti negli alcool.

Per includerli in paraffina si osservino le medesime norme, stabilite per quelli trattati colla colorazione di ematossilina alla Weigert (vedi sopra). Fatti i tagli, attaccati con l' albumina e privati poi

della paraffina, con il calore prima e poi con il bagno in xilolo si asciughino di questo e si coprano con uno strato di balsamo (vedi sopra).

3 - Terminazioni nervose.
Impregnazione col cloruro d'oro.

Si sprema dal succo di limone e si filtri, ed in questo filtrato si ponga per 30' il pezzetto anatomico in cui si vogliono studiare le terminazioni nervose. Si lavi in acqua distillata e s' immerga poi in una soluzione all'1 °/₀ di cloruro d'oro e si tenga all'oscuro per 12 ore. Quindi si torni a lavare e si ponga in 50 cm.c. d' acqua distillata, acidificata con 2 gocce d'acido acetico, e si riponga all' oscuro per 48 ore. Da qui si porti in alcool ordinario per 24 ore all'oscuro ; e così il pezzo è pronto per ulteriori manipolazioni.

4 - Terminazioni nervose sensitive nell'animale vivo
Colorazione col bleu di metilene col metodo di Ehrlich.

È questo uno splendido processo, recentissimo, che dobbiamo ad Ehrlich e per la sua grande importanza ho creduto di non dovere tralasciare di descrivervi. Metodo :

1) Si metta un cuore di rana vivente allo scoperto, senza ledere la vena mediana dello sterno ;

2) S'apra il pericardio, e con un colpo di forbici si tagli la punta del cuore asportandola ;

3) Dopo scolato il sangue dal cuore, s' innesti una siringa di Pravax (legandovela con cura) precedentemente piena della soluzione satura di bleu di metilene, non venefico, in cloruro di sodio a 0,75 %;

4) Si spinga lentamente e ad intervalli il pistone della siringa, fino a vuotare la cannula;

5) S'allacci il ventricolo e si tolga la cannula:

6) Si conservi l'animale vivo per almeno due ore:

7) S'immergano poi i pezzi dell'animale sezionato, per es. gamba, lingua, testa...... in soluzione alcoolica d'acido picrico al 2 %, al quale siano aggiunte alcune gocce d'ammoniaca.

I pezzi rimangano in questo liquido almeno per due ore, poi si osservino al microscopio, dissociandoli nel liquido stesso, o si montino in glicerina.

Le terminazioni nervose, che risultano così colorate, sono bellissime.

INDICE

LIBRI DA CONSULTARE.

L. Ranvier. Traité Technique d'Histologie (Paris. Librairie F. Savy, 1875).

Kahlden-Armanni. Tecnica per l'esame istologico di preparati anatomo-patologici (Pasquale Edit., Napoli 1891).

Bizzozero. Manuale di microscopia clinica (Vallardi Edit., Milano 1890).

Exner. Guide dans l'examen microscopique des Tissus animaux (Delahare Edit., Paris 1875).

Jaksch. La diagnosi clinica delle malattie interne (traduz. Manganotti — Vallardi Edit., Milano 1891).

Engel. Nouveaux éléments de chimie medicale et de chimie biologique (Baillière Edit., Paris 1875).

Poulsen. Microchimica vegetale (Loescher Edit., Torino 1871).

Stohr. Istituzioni d' istologia e di anatomia microscopica (trad. A. Antonelli — Pasquale Edit., Napoli 1871).

Lee ed Henneguy. Traité des Méthodes techniques de anatomie microscopique (Octave Doin Edit., Paris 1887).

LEGATORIA DI LIBRI A. STACERINI ROMA

Accademia